

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. April 2004 (15.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/030701 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 47/48**,
39/35

(74) Anwälte: **VON MENGES, Albrecht** usw.; Uexküll &
Stolberg, Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009750

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. September 2003 (02.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
102 42 076.9 11. September 2002 (11.09.2002) DE

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRESINIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH** [DE/DE]; Daimlerstr. 16, 61352 Bad Homburg (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): EICHNER, Wolfram** [DE/DE]; An der Landwehr 30, 35510 Butzbach (DE).
DORMANN, Dirk [DE/DE]; Dornfelderweg 30, 55246 Mainz-Kostheim (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** CONJUGATED HYDROXYALKYL STARCH ALLERGEN COMPOUNDS

(54) **Bezeichnung:** HYDROXYALKYLTÄRKE-ALLERGEN-KONJUGATE

(57) **Abstract:** The invention relates to a conjugated compound of hydroxyalkyl starch and an allergen, in which at least one hydroxyalkyl starch is covalently coupled to the allergen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Konjugat aus Hydroxyalkylstärke und Allergen, bei dem mindestens eine Hydroxyalkylstärke kovalent an das Allergen gekoppelt ist.



WO 2004/030701 A1

HYDROXYALKYLSTÄRKE-ALLERGEN-KONJUGATE

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die ein Konjugat aus einer Hydroxyalkylstärke (HAS) und einem Allergen umfassen, wobei die HAS entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an das Allergen gebunden ist. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung entsprechender Konjugate sowie deren Verwendung als Arzneimittel.

TECHNISCHER HINTERGRUND

Überschiessende, spezifische Reaktionen des Immunsystems gegen exogene Substanzen werden heute unter dem Begriff der Allergie zusammengefasst. Nach der Einteilung von Coombs und Gell lassen sich allergische Reaktionen in die Typen I bis IV untergliedern, die u.a. auf Basis der in die Reaktion involvierten Antikörperklassen, der erkannten Antigene sowie der induzierten Effektormechanismen differenziert werden können.

Als Allergene werden demgemäß Verbindungen bezeichnet, die eine allergische Immunreaktion, im engeren Sinne eine allergische Immunreaktion vom Soforttyp (Typ I), an Haut und Schleimhaut auslösen können. In der Regel handelt es sich bei den Allergenen um Polypeptide oder Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 5.000 bis etwa 80.000 Da. Die Polypeptide können pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ursprungs sein. Die Polypeptide können ferner als Bestandteile des Hausstaubs vorliegen.

Allergene induzieren IgE Antikörper, welche mit ihrem konstanten Teil an die Oberfläche von Mastzellen binden und dadurch eine Degranulation der Mastzellen bewirken. Die von Mastzellen freigesetzten Stoffe (Histamine, proteolytische Enzyme und Entzündungsmediatoren) verursachen unmittelbar und mittelbar die Symptome einer Allergie, üblicherweise Rhinitis, Konjunktivitis und/oder bronchiales Asthma.

IgE-vermittelte Soforttypallergien (Typ I) sind die mit Abstand am stärksten vorherrschende allergische Reaktionsform. Bis zu 20% der Menschen in Industrieländern leiden an Typ I-allergischen Symptomen. Allergiker werden derzeit neben der medikamentösen Therapie durch spezifische Immuntherapie, die sogenannten Hyposensibilisierungen, behandelt (Kleine-Tebbe et al., Pneumologie, Vol. 5 (2001), 438-444).

Bei der klassischen Hyposensibilisierung wird ein spezifischer Allergenextrakt subkutan in ansteigenden Quantitäten verabreicht, bis eine individuelle Erhaltungsdosis erreicht wird. Bei Fortführung der Behandlung wird diese Dosis wiederholt verabreicht, wobei verschiedene Behandlungsprotokolle zum Einsatz gelangen (Klimek et al., Allergologie und Umweltmedizin, Schattauer Verlag, S. 158 ff.).

Der Therapieerfolg scheint dabei in engem Zusammenhang mit den während der Erhaltungsphase eingesetzten Allergenquantitäten zu

stehen. Bei Erhöhung der verabreichten Allergenquantitäten steigt jedoch grundsätzlich auch das Risiko einer IgE-vermittelten Reaktion des allergischen Patienten an. Der Einsatz der Therapie wird mit anderen Worten auch durch die allergische Reaktion des Patienten und das damit für den Patienten einhergehende Risiko eines anaphylaktischen Schocks eingeschränkt.

Ein Erfolg der Therapie wird in einer Verminderung der allergischen Symptome gesehen, die zu einem individuellen Rückgang des Medikamentenbedarfs bzw. einem Anstieg der Toleranz gegenüber dem Allergen führt.

Es wurde bereits vorgeschlagen, einzelne allergene Polypeptide durch rekombinante Expression zu erzeugen und für eine Hyposensibilisierung zu verwenden (DE 100 41 541).

Um Allergene mit verringerten IgE-Bindungseigenschaften zu gewinnen, wurden diese mit Polyethylenglykol (PEG) modifiziert und für die Hyposensibilisierung verwendet. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen beschreibt dementsprechend die Herstellung von PEG-Allergen-Konjugaten, welche durch kovalente Bindung eines Allergens an Polyethylenglykol erzeugt wurden. Mosbech et al. (Allergy, 1990, Vol. 45(2):130-141) berichten beispielsweise die Behandlung von erwachsenen asthmatischen Allergikern mit PEG-Hausstaub-Konjugaten und die immunologische Reaktion nach der Behandlung. Die Autoren fanden eine klinische Verbesserung der Wirkung, sofern die Dosierung des Allergens ausreichte, um die Menge des spezifischen IgE zu reduzieren und/oder IgG, insbesondere IgG4, Reaktionen zu induzieren.

Ähnlich berichten Schafer et al., (Ann. Allergie, 1992, Vol. 68(4):334-339) über eine Studie, in der eine allergene Zusammensetzung aus einem PEG-modifiziertem Graspollenmix für die Hyposensibilisierung von Erwachsenen verwendet wurde. Die Ergebnisse wurden mit denen verglichen, die durch Hyposensibilisierung unter Verwendung des teilweise gereinigten Graspollen-

- 4 -

mix erhalten wurden. Die Behandlung erfolgte im Rahmen einer Doppelblindstudie. Die Frequenz und das Ausmaß der Nebenwirkungen konnte durch PEG-Modifizierung um etwa 50% verringert werden. Eine signifikante Verbesserung der Überempfindlichkeit wurde in beiden Behandlungsgruppen festgestellt.

PEG-Konjugate weisen jedoch keine in der Natur vorkommende Struktur auf, für die *in vivo* Abbauege beschrieben wurden.

10 Neben den PEG-Konjugaten sind auch andere Allergen-Derivate hergestellt und untersucht worden. So sind Dextran-modifizierte Allergene bekannt, die durch Konjugation mit Carboxymethyl-dextran erzeugt werden. Einige Studien mit beta-Laktoglobulin haben gezeigt, dass die Antikörperreaktion gegenüber Dextran-
15 Konjugaten im Vergleich mit nicht-modifizierten Verbindungen erheblich abgeschwächt ist (Kobayashi et al., J Agric Food Chem 2001 Feb; 49(2): 823-31; Hattori et al., Bioconjug Chem 2000 Jan-Feb; 11(1): 84-93).

20 Ferner wurden kreuzvernetzte, hochmolekulare Allergene erzeugt, sogenannte Allergoide. Diese Produkte konnten beispielsweise mittels Formaldehyd- oder Glutaraldehyd-Modifikation von Allergenen gewonnen werden. Entsprechende Produkte können von Allergopharma, Joachim Ganser KG, 21462 Reinbek; HAL Allergie
25 GmbH, 40554 Düsseldorf; und SmithKline Beecham Pharma GmbH, Benckard, 80716 München, erhalten werden.

Einen umfassenden Überblick über die Bandbreite verschiedener Verfahren zur Herstellung von Biokonjugaten im Allgemeinen gibt
30 G.T. Hermanson (Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego 1996). Die Verknüpfung von Oligo- und Polysacchariden mit Proteinen erfolgt dabei zumeist über Lysin- (-NH₂) oder Cystein- (-SH) Seitenketten und seltener über Asparagin- oder Glutaminsäure- (-COOH) oder auch Tyrosin- (Aryl-OH) Seitenketten.

35

- 5 -

Stärkederivate sind bisher jedoch für die Modifizierung von Allergenen nicht verwendet worden.

5 Hydroxyethylstärke beispielsweise ist ein substituiertes Derivat des in Maisstärke zu 95 % vorkommenden Kohlenhydrat-Polymer Amylopektin. HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zur Zeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8(8), (1987), S.271-278; und Weidler
10 et al., Arzneim.-Forschung/ Drug Res., 41, (1991) 494-498).

Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, wobei in den Hauptketten α -1,4-glykosidische Bindungen vorliegen, an den Verzweigungsstellen jedoch α -1,6-glykosidische Bindungen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieses Moleküls werden im Wesentlichen durch die Art der glykosidischen Bindungen bestimmt. Aufgrund der abgeknickten α -1,4-glykosidischen Bindung entstehen helikale Strukturen mit etwa 6 Glucose-Monomeren pro Windung.
20

Die physikalisch-chemischen als auch die biochemischen Eigenschaften des HES-Polymer können durch Substitution verändert werden. Die Einführung einer Hydroxyethylgruppe kann durch alkalische Hydroxyethylierung erreicht werden. Durch die
25 Reaktionsbedingungen kann die unterschiedliche Reaktivität der jeweiligen Hydroxylgruppe im unsubstituierten Glucosemonomer gegenüber der Hydroxyethylierung ausgenutzt werden, wodurch eine Einflussnahme auf das Substitutionsmuster möglich ist.

30 Daher wird HES im Wesentlichen über die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemonomere aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution")
35 beschrieben werden, womit die Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

- 6 -

HES-Lösungen liegen als polydisperse Zusammensetzungen vor, in denen sich die einzelnen Moleküle hinsichtlich des Polymerisationsgrades, der Anzahl und Anordnung der Verzweigungsstellen sowie ihres Substitutionsmusters voneinander unterscheiden. HES ist somit ein Gemisch von Verbindungen mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Dementsprechend wird eine bestimmte HES-Lösung durch ein durchschnittliches Molekulargewicht anhand statistischer Größen bestimmt. Dabei wird M_n als einfaches arithmetisches Mittel in Abhängigkeit von der Anzahl der Moleküle errechnet (Zahlenmittel), während M_w , das Gewichtsmittel, die masseabhängige Messgröße darstellt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, verbesserte Allergen-Derivate zur Verfügung zu stellen, insbesondere Allergen-Derivate, die einen Depot-Effekt erzielen und daher weniger oft verabreicht werden müssen.

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Konjugate aus Hydroxyalkylstärke (HAS) und Allergen gelöst, bei denen mindestens eine Hydroxyalkylstärke kovalent an das Allergen gekoppelt ist.

Erfindungsgemäß wurde demgemäß überraschenderweise festgestellt, dass die HAS-Allergen-Konjugate in besonders vorteilhafter Weise für die spezifische Immuntherapie verwendet werden können. Die Sicherheit der Hyposensibilisierung wird durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Konjugate erhöht. Gleichzeitig weisen die erfindungsgemäßen Konjugate eine höhere *in vivo* Halbwertszeit auf, womit durch die Konjugierung mit HAS ein Depoteffekt erzielt wird, der die klinische Wirksamkeit positiv beeinflusst. Insbesondere gegenüber wässrigen Allergenextrakten weist der Depoteffekt der erfindungsgemäßen Konjugate den Vorteil auf, dass diese weniger häufig verabreicht werden müssen, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen.

Im Vergleich zu nicht-modifizierten Allergenen können die erfindungsgemäßen HAS-Allergen-Konjugate so hergestellt werden,

- 7 -

dass sie eine verringerte Bindung an Allergen-spezifisches IgE aufweisen. Die HAS-Allergen-Konjugate können gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform nur eine sehr geringe oder gar keine spezifische Bindung an Allergen-spezifisches IgE aufweisen. Die erfindungsgemäßen Konjugate können somit in höherer Dosierung appliziert werden, was wiederum die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Hyposensibilisierung erhöht.

Gegenüber vernetzten Allergoiden weisen die HAS-Allergen-Konjugate der vorliegenden Erfindung den Vorteil auf, dass sie ein dem natürlichen Allergen vergleichbares Epitop-Profil liefern können. Die Effizienz der Immuntherapie kann somit erhöht werden. Demgegenüber führt die Polymerisation von Allergenen mittels Formaldehyd oder Glutaraldehyd zu schlecht definierten hochmolekularen Verbindungen (Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1990; 6(4): 315-65), die nicht-natürliche Epitope erzeugen können, so dass deren Wirkung im Einzelfall untersucht werden müsste.

In dem Konjugat ist mindestens eine Hydroxyalkylstärke an ein Allergen gekoppelt. Vom Umfang der Erfindung umfaßt sind natürlich auch Kopplungsprodukte, die mehrere Hydroxyalkylstärke-Moleküle und ein Allergen-Molekül oder mehrere Allergen-Moleküle und ein Hydroxyalkylstärke-Molekül aufweisen.

Die Hydroxyalkylstärke kann unmittelbar an das Allergen oder über einen Linker an das Allergen gekoppelt in dem Konjugat vorliegen. Ferner kann die Hydroxyalkylstärke an die Polypeptidkette oder an eine oder mehrere der Saccharidketten eines allergenen Glykoproteins gekoppelt sein.

HYDROXYALKYLSTÄRKE (HAS)

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Hydroxyalkylstärke" dazu verwendet, um Stärkederivate zu bezeichnen, die mit einer Hydroxyalkylgruppe substituiert wurden. Vorzugsweise umfaßt die Hydroxyalkylgruppe 2 bis 4 C-Atomen. Die als

"Hydroxyalkylstärke" bezeichnete Gruppe umfaßt somit vorzugsweise Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke und Hydroxybutylstärke. Die Verwendung von Hydroxyethylstärke (HES) als Kopp-

5 lungspartner ist für alle Ausführungsformen der Erfindung besonders bevorzugt.

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, dass die Hydroxyethylstärke, die für die Herstellung der Konjugate eingesetzt wird, ein mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel) von 1-300 kDa auf-

10 weist, wobei ein mittleres Molekulargewicht von 5 bis 200 kDa besonders bevorzugt ist. Hydroxyethylstärke kann ferner einen molaren Substitutionsgrad von 0,1-0,8 und ein Verhältnis von C₂:C₆-Substitution im Bereich von 2-20, jeweils bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, aufweisen.

15 ALLERGENE

Als Allergene werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung in erster Linie Verbindungen bezeichnet, die allergische Immunreaktionen, im engeren Sinne IgE-vermittelte Überempfindlich-

20 keitsreaktionen (Typ I) auslösen können. Ferner umfaßt sind aus der Sequenz eines Allergens abgeleitete Peptide wie beispielsweise aus enzymatischen Spaltungen resultierende Spaltprodukte. Entsprechende Allergene werden für die spezifische Immuntherapie eingesetzt und sind kommerziell erhältlich.

25 Allergene können aus natürlichen Quellen isoliert werden. So werden z.B. im Fall der Pollenallergene Allergenextrakte aus den jeweiligen Pollen gewonnen. Ferner können die Allergene beispielsweise rekombinant hergestellt werden.

30 Vorzugsweise handelt es sich bei den Allergenen um Verbindungen, die aus der Gruppe bestehend aus Polypeptiden, Proteinen, und Glykoproteinen ausgewählt wurden.

HERSTELLUNGSVERFAHREN

Gemäß eines Aspektes betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von HAS-Allergen-Konjugaten, bei denen man HAS entweder unmittelbar oder über einen Linker kovalent an das Allergen koppelt. Die Kopplung kann dabei auf verschiedenen Wegen erfolgen. Eine allgemeine Struktur für eine Neoglycoprotein-Synthese unter Verwendung eines Linkers wird in Fig. 1 gezeigt.

Gemäß einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von HAS-Allergen-Konjugaten, in denen HES an eine ϵ -NH₂-Gruppe, an eine α -NH₂-Gruppe, an eine SH-Gruppe, an eine COOH-Gruppe oder an eine -C(NH₂)₂-Gruppe eines Allergens gebunden wird.

Die Erfindung umfaßt ferner Verfahren, bei denen man HES mittels reduktiver Aminierung an die ϵ -NH₂-Gruppe eines Proteins koppelt. Alternativ dazu betrifft die Erfindung Verfahren, bei denen das Allergen an die reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke gekoppelt wird.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Verfahren, bei denen für der Kopplung an das Allergen eine aktive Gruppe in die HAS eingeführt wird. Die aktive Gruppe kann beispielsweise eine Aldehyd-, Thiol- oder eine Amino-Funktion sein.

Das Allergen und das Oligo- oder Polysaccharid können entweder direkt oder unter Verwendung eines Linkers aneinander gekoppelt werden. Als Linker kann ein beliebiges Vernetzungsmittel eingesetzt werden. Der Linker kann beispielsweise ein bifunktionaler Linker oder ein homo- oder heterobifunktionaler Cross-Linker sein.

Zahlreiche Vernetzungsmittel, wie beispielsweise SMCC (Succinimidyl-4-(N-maleimido-methyl)cyclohexan-1-carboxylat), sind kommerziell erhältlich und dem Fachmann geläufig (vgl. alpha-

- 10 -

betische Liste der "Cross-linking Reagents" im Produktkatalog der Firma Perbio und www.piercenet.com) und können im Rahmen der vorliegenden Erfindung zum Einsatz gelangen.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform die mittels der beschriebenen Verfahren erhältlichen HAS-Allergen-Konjugate.

10 Nachfolgend werden einige Verfahren zur Synthese von HAS-Allergen-Konjugaten allgemein dargestellt. Der auf dem Gebiet der Biokonjugate tätige Durchschnittsfachmann wird keine Probleme haben, aus den beschriebenen Verfahren solche auszuwählen, die im Hinblick auf die zu lösenden Aufgaben (gewähltes Allergen, gewähltes HAS, etc.) besonders geeignet sind.

15

Direkte Kopplung unmodifizierter HAS an allergene Proteine durch reduktive Aminierung:

- 20 Ein einfaches und schonendes Verfahren, das ohne eine Modifizierung der HAS durchgeführt werden kann, stellt die direkte Kopplung der HAS an die ϵ -Aminogruppen des allergenen Proteins über eine reduktive Aminierung in Gegenwart von NaCN/BH₃ dar (G.R. Gray, Arch. Biochem. Biophys. 1974, 163, 426-28) (Fig. 25 2.1a).

Als Reduktionsmittel können auch Pyridin-Boran und andere Amino-Boran Komplexe eingesetzt werden, die stabiler und leichter zu handhaben sind (J.C. Cabacungan et al., Anal. Biochem. 1982, 30 124, 272-78). Im Gegensatz zu einer Acylierung bleibt die modifizierte Aminogruppe des Proteins unter physiologischen Bedingungen weiterhin positiv geladen. Daher sind die Auswirkungen auf die Tertiärstruktur des Proteins bei der reduktiven Aminierung geringer. Bei diesem Verfahren geht jedoch die Ringstruktur des reduzierenden Zuckers verloren.

35

Verfahren zur Kopplung von modifizierten HAS:*Oxidation des reduzierenden Endes zu Aldonsäuren*

Bei der selten genutzten Oxidation mit Jod (oder Brom) zur
entsprechenden Aldonsäure (G. Ashwell, Methods Enzymol. 1972,
28, 219-22) geht die Ringstruktur des reduzierenden Zuckers
verloren (Fig. 2.1b), zudem ist eine sorgfältige Reaktionskon-
trolle nötig, um unspezifische Oxidation zu vermeiden. Die
gebildete Carbonsäurefunktion kann in Gegenwart von EDC (1-
Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) (J. Lönngren, I.J.
Goldstein, Methods Enzymol. 1994, 247, 116-118) mit den ϵ -Amino-
gruppen der Lysinseitenketten des allergenen Proteins oder
über einen Hydrazid-Linker (siehe Fig. 3) gekoppelt werden.
Analog können auch die in den Polysaccharid-Strukturen vorlie-
genden Carboxyl-Gruppen von z.B. Mannuron-, Glucuron- oder
Sialinsäuren zur Kopplung verwendet werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorlie-
genden Erfindung werden Verbindungen bereitgestellt, die aus
einem HES-Allergen-Konjugat bestehen, in der das Allergen spe-
zifisch an die reduzierenden Endgruppen der Hydroxyethylstärke
gebunden ist. Dafür kann man die reduzierenden Endgruppen zuvor
selektiv oxidieren, beispielsweise nach dem in Hashimoto et al.
(Kunststoffe, Kautschuk, Fasern, Vol. 9, (1992) S. 1271-1279)
beschriebenen Verfahren zur Oxidation der reduzierenden Alde-
hyd-Endgruppe eines Saccharids.

Aktivierung der Hydroxyfunktion der HAS

Eine der gebräuchlichsten Methoden für eine unspezifische Akti-
vierung von Polysacchariden stellt die Umsetzung mit Bromcyan
(CNBr) dar (C. Chu et al., Infect. Immun. 1983, 40, 245-56)
(Fig. 2.1c). Die aktivierten Hydroxygruppen acylieren Lysin-,
Cystein- und Histidin-Seitenketten des Proteins. Dieses Kopp-
lungsverfahren kann jedoch Nachteile aufweisen, welche auf den
hohen pH-Wert sowie auf die Toxizität und schlechte Handhab-
barkeit zurückzuführen sind.

Eine Alternative zu CNBr bietet CDAP (1-Cyano-4-dimethylamino-pyridiniumtetrafluorborat) (A. Lees et al., Vaccine 1996, 14, 190-98; D.E. Shafer et al., Vaccine 2000, 18, 1273-81) mit erhöhter Reaktivität der Cyano-Gruppe, das eine Reaktion unter
5 sehr viel milderen Bedingungen ermöglicht.

Generell können die unspezifischen Aktivierungen von Polysacchariden zu einer mehrfachen Substitution und damit auch zu Kreuzvernetzungen zwischen Polysaccharid und Protein führen.
10 Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen läßt sich dies jedoch weitgehend unterbinden.

Einführung von Aldehyden

Auch in nicht reduzierenden Polysacchariden können Aldehyd-
15 Funktionen durch die Spaltung vicinaler Hydroxygruppen mit NaIO₄ eingeführt werden (J.M. Bobbit, Ad. Carbohydr. Chem. 1956, 11, 1-41) (Fig. 2.1d), wobei über die Konzentration der Natriumperiodat-Lösung eine ausreichende Selektivität erreicht werden kann. Besonders leicht zu oxidieren ist Sialinsäure (S.M. Ch-
20 mov et al., Biol. Chem 1992, 267, 15916-22).

Eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der direkten reduktiven Aminierung mit reduzierenden Polysacchariden kann durch die Einführung von Aldehydgruppen erreicht werden, die
25 nicht zu Halbacetalen cyclisieren. Dies kann durch eine Reduktion des reduzierenden Endes zum Zuckeralkohol und einer anschließenden selektiven Oxidation der vicinalen Dirole im geöffneten Zuckeralkohol erreicht werden (Y.C. Lee, R.T. Lee, Neoglycoproteins: Preparation and Application, Academic Press,
30 San Diego 1994) (Fig. 2.1d).

Neben der direkten Kopplung der Aldehyd-modifizierten Polysaccharide mit Aminofunktionen des Proteins durch reduktive Ami-
nierung ist auf diesem Weg auch eine Modifizierung des Polysac-
35 charids mit bifunktionellen Hydrazid-Linkern möglich (siehe unten).

Einführung von Amino-Funktionen

Gegenüber den Polysacchariden ergeben sich bei Oligosacchariden (mit bis zu 20 Kohlenhydrat-Monomeren) aufgrund der etwas höheren Reaktivität bessere Möglichkeiten, den reduzierenden Zucker über eine reduktive Aminierung zu Glycaminen oder zu Glycosylaminen mit intakter Ringstruktur umzusetzen (Fig. 2.2).

Für die Kopplung der Amino-modifizierten Polysaccharide an die verschiedenen Seitenkettenfunktionen des Proteins bietet sich der Einsatz eines bifunktionellen Linkers an (siehe unten).

Einführung von Amino-Funktionen durch reduktive Aminierung

Im Gegensatz zu der Glycaminsynthese durch reduktive Aminierung mit NH_3 oder aliphatischen Aminen (B. Kuberan et al., Glycoconj. J. 1999, 16, 271-81), können mit aromatischen Aminen wie z.B. Benzylamin (T. Yoshida, Methods Enzymol. 1994, 247, 55-64), 2-(4-Aminophenyl)ethylamin (APEA) (H.D. Grimmecke, H. Brade, Glycoconj. J. 1998, 15, 555-62) oder 4-Trifluoracetamidoanilin (E. Kallin, Methods Enzymol. 1994, 247, 119-23) unter vergleichbaren Bedingungen höhere Ausbeuten erzielt werden (Fig. 2.2a).

Während bei APEA die unterschiedliche Reaktivität der aliphatischen und aromatischen Aminofunktionen für eine selektive Reaktion ausgenutzt wird, steht mit 4-Trifluoracetamidoanilin eine mono-geschützte Verbindung zur Verfügung (alternativ wird auch Benzyloxycarbonylaminoanilin eingesetzt (M. Barström et al., Carbohydr. Res. 2000, 328, 525-31)), wobei durch nachfolgende Abspaltung der Trifluoracetyl-Gruppe wiederum eine aromatische Aminofunktion freigesetzt wird. Zudem hat sich gezeigt, dass die Glycamine durch eine einfache N-Acetylierung mit Essigsäureanhydrid vor der Abspaltung der TFA-Schutzgruppe stabilisiert werden können.

Einführung von Amino-Funktionen durch N-Glycosilierung

Die N-Glycosilierung (Fig. 2.2b) bietet eine Möglichkeit, die cyclische Ringstruktur des reduzierenden Zuckers zu erhalten. Die durch Umsetzung mit Ammoniumhydrogencarbonat erhaltenen instabilen β -Glycosylamine (I.D. Manger et al., Biochemistry 1992, 31, 10724-32; I.D. Manger et al., Biochemistry 1992, 31, 10733-40; S.Y.C. Wong et al., Biochem. J. 1993, 296, 817-25, E. Meinjohannes et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1998, 549-60) lassen sich durch nachfolgende Acylierung mit Chloressigsäureanhydrid stabilisieren und durch Aminolyse zu den 1-N-Glycyl-Verbindungen mit freier Amino-Funktionalität umsetzen. Analog kann die N-Glycosilierung mit Allylamin durchgeführt werden und, nach Stabilisierung durch N-Acetylierung, Cysteamin photochemisch an die Doppelbindung addiert werden (D. Ramos et al., Angew. Chem. 2000, 112, 406-8).

Darstellung von Amino-Funktionen aus den Aldonsäuren

In die durch Oxidation von reduzierenden Polysacchariden zugänglichen Aldonsäuren können durch Umsetzung mit Diaminen freie Aminofunktionen eingeführt werden. Dies ist durch die Reaktion der Säure mit Carbodiimiden und Diaminen möglich. Alternativ können die durch Dehydratisierung der Aldonsäuren zugänglichen Lactone mit Diaminen umgesetzt werden (S. Frie, Diplomarbeit, Fachhochschule Hamburg, 1998).

Kopplungsreaktionen von modifizierter HES und allergenen Proteinen mittels bifunktioneller Linker

So vielfältig wie die funktionellen Gruppen modifizierter HES und Protein-Seitenketten, die über einen Linker miteinander verbunden werden sollen, sind auch die zur Verfügung stehenden Reaktionsmöglichkeiten (Fig. 3 zeigt gängige Linker-Aktivierungen).

- 15 -

Bei den reaktiven Gruppen kann unterschieden werden zwischen Reaktivität gegenüber Amino-Gruppen (NHS-Ester, Imido-Ester und Arylazide), Aldehyden und (in Gegenwart von EDC) Carbonsäuren (Hydrazide) oder SH-Gruppen (Maleinimide, Halogenacetate oder Pyridyldisulfide).

Reagenzien mit Amin-Reaktivität

Unter den Kopplungsreagenzien sind die Amin-reaktiven Cross-Linker die gebräuchlichsten. Dabei stellen die N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester (Fig. 3.1a) die gängigste Form der Aktivierung dar. Unter Abspaltung von NHS werden hierbei die acylierten Verbindungen gebildet. Eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung primärer Amine bieten die Imido-Ester (F.C. Hartman, F. Wold, Biochemistry 1967, 6, 2439-48) (Fig. 3.1b), wobei Imidoamide (Amidine) gebildet werden. Die Imidoester werden vielfach als Protein-Crosslinker eingesetzt und zeichnen sich durch minimale Reaktivität gegenüber anderen Nucleophilen aus. Weiterhin stehen verschiedene Arylazid-Linker zur Verfügung (photoreaktive Cross-Linker), bei denen durch Photolyse kurzlebige Nitrene gebildet werden. Über eine Ringerweiterung entstehen hieraus (anstatt einer unspezifischen Insertion) Dehydroazepine, die bevorzugt mit Nucleophilen, insbesondere Aminen, reagieren (Fig. 3.1c).

Aufgrund der Vielzahl kommerziell erhältlicher Kopplungsreagenzien mit Amino-Aktivität und variablen Linkern haben andere Reaktionsmöglichkeiten, wie z.B. die Umsetzung mit Isocyanaten und Isothiocyanaten zunehmend an Bedeutung verloren.

Reagenzien mit Reaktivität gegenüber Carbonyl- oder Carboxyl-Gruppen

Hydrazid-Linker werden für die Kopplung von Verbindungen mit Carbonyl- oder Carboxy-Gruppen verwendet (D.J. O'Shanessy, M. Wilchek, Anal. Biochem 1990, 191, 1-8) (Fig. 3.2). Während Aldehyde zu Hydrazonen umgesetzt werden, die durch Reduktion mit NaCN/BH₃ stabilisiert werden können, reagieren Carboxyl-

Gruppen in Gegenwart von EDC unter Bildung von Imid-Bindungen. Die Hydrazid-aktivierten Linker stellen eine vielseitige Alternative zur reduktiven Aminierung und zu den Carboxyl-Aktivierungen mit 'Zero-length' Cross-Linkern wie Carbonyl-diimidazol (CDI) dar.

Reagenzien mit Sulfhydryl-Reaktivität

Kopplungsreagenzien mit SH-Reaktivität stellen eine zweite große Klasse von Cross-Linkern dar. Die Kopplungsreaktionen umfassen primär zwei Reaktionswege: Alkylierung (Fig. 3.3a-b) oder Disulfid-Austausch (Fig. 3.3c). Unter Ausbildung einer stabilen Thioether-Bindung kann, neben der Alkylierung mit α -Halogenacetaten, die Doppelbindung der Maleinimide durch eine Michael-Addition selektiv mit SH-Gruppen umgesetzt werden. Der Thiol-Disulfid-Austausch stellt eine weitere Sulfhydryl-spezifische Reaktion dar. Hierbei erweist sich die Reaktion mit den Pyridyldisulfiden (J. Carlsson et al., Biochem J. 1978, 173, 723-37) als besonders vorteilhaft, da unter Abspaltung von 2-Pyridon ein vollständiger Umsatz zu den gemischten Disulfiden erreicht werden kann.

Cross-Linker

Für die Synthese der erfindungsgemäßen HAS-Allergen-Biokonjugate kommen die obengenannten Kopplungsreaktionen durch vielfältige homo- und heterobifunktionelle Cross-Linker zur Anwendung.

Homobifunktionelle Cross-Linker

Symmetrische homobifunktionelle Linker (vgl. z.B. die in Fig. 4.1 dargestellten) besitzen an beiden Enden dieselbe reaktive Gruppe und sind dazu geeignet, Verbindungen mit gleichen funktionellen Gruppen miteinander zu verknüpfen. Gemäß den zur Verfügung stehenden Kopplungsreaktionen sind entsprechende bifunktionelle Linker mit z.B. Bis-Imidoester, Bis-Succinimid, Bis-Hydrazid und Bis-Maleinimid-Funktionalitäten kommerziell erhältlich.

- 17 -

Ein Nachteil in der Verwendung von homobifunktionellen Linkern besteht darin, dass selbst bei der Verwendung eines großen Überschusses an Cross-Linker bei der Aktivierung der ersten Verbindung ein Cross-Linking nicht vollständig verhindert werden kann (S. Bystrick et al., Glycoconj. J. 1999, 16, 691-95). Dessen vollständige Abtrennung ist vor der Kopplung mit der zweiten Verbindung notwendig und kann bei Instabilität des aktivierten Zwischenproduktes schwierig sein (z.B. Hydrolyseempfindlichkeit der NHS-aktivierten Verbindungen). Sowohl Amin-Reaktivität als auch die Hydrolyse der NHS-Ester nehmen mit steigendem pH-Wert zu, weshalb Reaktionen unter physiologischen Bedingungen (pH 7) in gepufferten Lösungen durchgeführt werden (Halbwertszeit des NHS-Esters DSP beträgt bei 0°C und einem pH-Wert von 7, 4-5 Stunden, bei pH 8.6 nur noch 10 min; A.J. Lomant, G. Fairbanks, J. Mol. Biol. 1976, 104, 243-261).

Heterobifunktionelle Cross-Linker

Mit heterobifunktionellen Kopplungsreagenzien (vgl. z.B. die Fig. 4.2 dargestellten) lassen sich Verbindungen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen miteinander verknüpfen. Die Linker sind mit zwei verschiedenen reaktiven Gruppen versehen und durch Kombination verschiedener Kopplungsreaktionen kann selektiv an einem Ende des Cross-Linkers umgesetzt werden. So zeigt z.B. die eine Seite des Linkers Amino-, die andere Sulfhydryl-Aktivität, wodurch sich gegenüber den homobifunktionellen Linkern eine bessere Möglichkeit zur Reaktionskontrolle ergibt.

Zunächst wird die reaktivere bzw. instabilere Seite des heterobifunktionellen Linkers umgesetzt. Da NHS-Ester nicht nur mit Amino-Gruppen unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung, sondern auch mit Sulfhydryl- und Hydroxyl-Gruppen reagieren können, wird zunächst der heterobifunktionelle Linker mit der Amino-Verbindung umgesetzt. Die Maleiminido-Gruppe zeigt demgegenüber nicht nur größere Selektivität, sondern in wässriger Lösung auch eine größere Stabilität, so dass das aktivierte

Intermediat aufgereinigt und anschließend selektiv mit der Verbindung mit Sulfhydryl-Aktivität umgesetzt werden kann.

Die Wahl des Cross-Linkers richtet sich nicht nur nach der Art der funktionellen Gruppen, die für die Kopplung genutzt werden sollen, sondern auch nach gewünschter Länge und Zusammensetzung, der sogenannten 'cross-bridge' des Spacers. So rufen einige Spacer, insbesondere solche mit starrer Ringstruktur wie z.B. SMCC oder MBS, eine spezifische Antikörper-Reaktion hervor (J.M. Peeters et al., J. Immunol. Methods 1989, 120, 133-43) und können somit für Hapten-Carrier-Immunogene und eine *in vivo* Anwendung weniger geeignet sein.

Bei der Zusammenstellung der Linker in Fig. 4 sind die spezifisch spaltbaren Linker, die sich durch Disulfid-Spaltung (z.B., DSP, DTME oder DTBP) oder Periodat-Spaltung (Dirole wie BMDB oder DST) öffnen lassen und die zur Studie biospezifischer Interaktionen oder zur Reinigung unbekannter Target-Strukturen verwendet werden, ausgelassen worden.

Die verwendeten Abkürzungen der kommerziell erhältlichen Kopplungsreagenzien sind aus den systematischen Namen der Verbindungen abgeleitet, wie z.B. DMA (Dimethyladipimidat), DMS (Dimethylsuberimidat), GMBS (N-(γ -Maleimidobutyryloxy)succinimidester) etc.

Eine Übersicht über verschiedene heterobifunktionelle Cross-Linker, die beispielsweise für Sulfhydryl-Kopplungen genutzt werden könnten, ist in Fig. 5 gezeigt.

Die größte Vielfalt bieten hier die Maleinimid-aktivierten Linker, meist kombiniert mit einer NHS-Ester-Aktivierung. Diese Linker mit Sulfhydryl- und Amino-Reaktivität sind wasserunlösliche, linear Alkyl-verbrückte Linker wie z.B. AMAS, GMBS und EMCS oder besitzen wie SMCC, SMPB oder MBS eine starre Ringstruktur. Die beiden UV-aktiven Linker SMPB und MBS werden

üblicherweise für immunchemische Verfahren wie ELISA-Tests verwendet.

5 Mit M_2C_2H ist darüberhinaus ein Linker mit derselben starren Verbrückung wie bei SMCC, aber mit Hydrazid-Aktivierung zur Verknüpfung von Verbindungen mit Sulfhydryl- und Carbonyl- oder Carboxyl-Aktivität gegeben.

10 Im Gegensatz zu den wasserunlöslichen Linkern, die vor der Reaktion zunächst in einem organischen Lösungsmittel wie DMF oder DMSO gelöst werden müssen, stehen mit den hydrophylen Sulfo-NHS Estern (J.V. Staros, Biochemistry 1982, 21, 3950-55), wie z.B. Sulfo-GMBS, Sulfo-EMCS und Sulfo-SMCC, außerdem die wasserlöslichen Varianten einiger Linker zur Verfügung.

15 Neben den Maleinimid-aktivierten heterobifunktionellen Linkern sind für Sulfhydryl-Kopplungen ferner diverse Halogenacetate, wie z.B. SIA (und das Brom-Analogon), SIAB und SBAP (Fig. 5.2), und Pyridyldisulfide wie SPDP und LC-SPDP und Sulfo-LC-SPDP (Fig. 5.3), wiederum in Kombination mit einer NHS-Ester Aktivierung für eine Amino-Kopplung, verwendbar. Halogenacetate können in aminierte Polysaccharide auch durch eine Reaktion mit der freien Säure und wasserlöslichem Carbodiimid (N.J. Davies, S.L. Flitsch, Tetrahedron Lett. 1991, 32, 6793-6796) bzw. mit dem entsprechenden Anhydrid (I.D. Manger et al., Biochemistry 20 1992, 31, 10733-40; S.Y.C. Wong et al., Biochem. J. 1994, 300, 843-850) eingeführt werden (vgl. Fig. 2.2b).

30 Für die Kopplung synthetischer Oligosaccharide an SH-Seitenketten von Proteinen über heterobifunktionelle Maleinimid-Linker sind in der Literatur diverse Beispiele zu finden (V. Fernandez-Santana et al., Glycoconj. J. 1998, 15, 549-53; G. Ragupathi et al., Glycoconj. J. 1998, 15, 217-21; W. Zou et al., Glycoconj. J. 1999, 16, 507-15; R. Gonzalez-Lio, J. Thiem, Carbohydr. Res. 1999, 317, 180-90). Außerdem werden auch direkte Kopplungen von Iodacetatamid-Derivaten von Oligosacchariden

für die spezifische Glycosylierung von Proteinen verwendet (N.J. Davies, S.L. Flitsch, Tetrahedron Lett. 1991, 32, 6793-679645; S.Y.C. Wong et al., Biochem. J. 1994, 300, 843-850).

5

Modifikation von Glycoproteinen am Glyco-Teil mit Poly- und Oligosacchariden:

Alternativ zu den Aminosäure-Seitenketten des Proteins bieten bei Glycoproteinen auch die gebundenen Oligosaccharide weitere
10 Verknüpfungsstellen zur Bildung der erfindungsgemäßen Konjugate (J.J. Zara et al., Anal. Biochem. 1991, 194, 156-62).

Einführung von Aldehyden durch eine Oxidation mit Natriumperjodat

15 Durch die Oxidation mit Natriumperiodat lassen sich auch in nicht reduzierende Oligosaccharide Aldehyde einführen. Je nach Wahl der Oxidationsbedingungen können vorhandene Sialinsäuren selektiv oxidiert werden oder weniger selektiv auch Fucose-, Mannose-, Galactose- und N-Acetyl-Glucosamin-Reste oxidiert
20 werden (S.M. Chamov et al., J. Biol. Chem. 1992, 267, 15916-22). Als Nebenreaktion ist die Bildung von Aldehyden aus n-terminalem Serin, Cystein oder Threonin möglich (D.J. O'Shanessy, M. Wilchek, Anal. Biochem. 1990, 191, 1-8).

25 *Enzymatische Einführung von Aldehyden*

Die Oxidation von Glycoproteinen mit Galactose-Oxidase führt zur Bildung von C6-Aldehyden an terminalen Galactosen oder N-Acetylgalactosaminen. Besonders in Glycoproteinen aus tierischen Zellen sind diese Zucker jedoch nicht terminal, sodass
30 sie erst in einem vorangehenden Schritt zugänglich gemacht werden müssen (D.J. O'Shanessy, M. Wilchek, Anal. Biochem. 1990, 191, 1-8).

PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich pharmazeutische Zusammensetzungen, welche ein erfindungsgemäßes HAS-Allergen-Konjugat enthalten. Die erfindungsgemäßen Konjugate sind in
5 besonders vorteilhafter Weise zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen geeignet, welche für die Hyposensibilisierung von Allergikern eingesetzt werden können. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen sind insbesondere zur Therapie von Allergikern geeignet, bei denen eine IgE-vermittelte
10 Sensibilisierung nachgewiesen wurde und entsprechende klinische Symptome beobachtet wurde.

Demgemäß können die erfindungsgemäßen Konjugate insbesondere zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet werden, welche zur spezifischen Immuntherapie von Patienten
15 mit klinisch relevanten Reaktionen auf Sofort-Typ-Allergene geeignet sind, wie beispielsweise Pollen-, Milben-, Säugetierhaar(-speichel)-, Pilz-, Insekten-, Nahrungsmittel- und Naturkautschuk/Latex-Allergiker. Die Immuntherapie eignet sich somit
20 insbesondere für die Behandlung von Asthmatikern und Heuschnupfen-Patienten.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können in verschiedenen Formen der spezifischen Immuntherapie, insbesondere Hyposensibilisierung, eingesetzt werden. So kann die Hyposensibilisierung durch subkutane, mukosale, orale, perorale oder sublinguale Verabreichung der erfindungsgemäßen HES-Konjugate erfolgen.
25 Ferner kann die Hyposensibilisierung in Form verschiedener Behandlungsprotokolle (präseasonal/perennial) durchgeführt werden.
30

Insbesondere bei Insektenallergikern kann es sich anbieten, die Therapie nach dem Rush- oder Ultra-Rush-Verfahren durchzuführen (vgl. Kleine-Tebbe et al., Pneumologie, Vol. 5 (2001), 438-
35 444).

Für die Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzungen werden die erfindungsgemäßen Konjugate mit für die Hyposensibilisierung geeigneten Träger- und/oder Hilfsstoffen vermischt.

5 Konjugat aus HES und allergenem Glykoprotein

Bei der Herstellung von HES-Glykoprotein-Konjugaten können beispielsweise die folgenden Typen chemischer Funktionalitäten des Glykoproteins für die Kopplung genutzt werden:

- 10 A: die Thiol-Gruppe einer Cystein-Seitenkette
B: die Aldehydgruppe eines oxidierten Galactose-Restes.

Bei Proteinen, die nicht glykolysiert sind, entfällt demgemäß Alternative B.

15 HES zeichnet sich durch ein einziges reduktives Ende aus. Aufgrund dieses Strukturmerkmals ist HES im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonderes gut für eine gezielte regioselektive Verknüpfung geeignet.

20 Für die HES-Protein-Konjugat-Synthese können Konzepte der chemischen Ligation zum Einsatz gelangen, welche für die Konstruktion von größeren Proteinen aus ungeschützten Peptidfragmenten entwickelt wurden. Diese Konzepte basieren auf der Wahl von je-
25 weils singulären reaktionsfähigen Funktionen in den zu verknüpfenden Fragmenten, die in Gegenwart der Vielzahl anderer Funktionen in natürlichen Proteinen selektiv miteinander zu einem stabilen Endprodukt reagieren.

30 Im Allgemeinen wird das HES-Präparat zunächst in ein definiertes, hochgereinigtes und gut charakterisiertes Zwischenprodukt (reactivHES) überführt, welches dann spontan und regioselektiv unter physiologischen Bedingungen mit der Zielfunktion des Allergens reagieren kann.

Bevorzugt wird die selektive Überführung des reduktiven Endes von HES in eine primäre Aminofunktion (1-Amino-HES). Dieses »1-Amino-HES« kann dann in flexibler Weise an die Verknüpfungsreaktion mit dem Protein angepasst werden, wobei verschiedene Synthesewege durchlaufen werden können und Reaktionsschritte durch vorgefertigte Reagenzien (Linker) zu einem Schritt vereinigt werden können.

HS-reaktivHES

Im folgenden werden alternative Verfahren zur Herstellung von HS-reaktivHES schematisch beschrieben und bewertet:

1. - Reduktive Aminierung von HES mit dem bifunktionellen Linker M_2C_2H (Fig. 5.1.b) zum HS-reaktivHES (A);
- Reinigung durch Dialyse und Gefriertrocknung;
- Kopplung des HS-Proteins durch Michael-Addition.

Diese Synthese weist besondere Vorteile auf, da sie sehr einfach ist (1-Schritt) und die Reaktion mit dem Zielprotein erfolgt sehr selektiv. Sofern die Toxizität von Hydrazinderivaten Probleme bereitet, müssen diese anschließend durch im Stand der Technik bekannte Reinigungsverfahren aufgereinigt werden.

2. - Umsetzen des HES-Lactons (oxidiertes HES) mit dem bifunktionellen Linker M_2C_2H (Fig. 5.1.b) zum HS-reaktivHES (B);
- Reinigung durch Dialyse und Gefriertrocknung;
- Kopplung des HS-Proteins durch Michael-Addition.

Diese Reaktion unterscheidet sich von der oben unter 1. Beschriebenen durch zusätzlichen Aufwand für die Herstellung des HES-Lactons.

3. - Umsetzung von HES mit Ammoniumhydrogencarbonat zu 1-Amino-HES (C);
- Reinigung durch Gefriertrocknung;

- 24 -

- Acylierung des 1-Aminals mit Brom/Jodacetanhydrid ohne Basenkatalyse zum Brom/Jodacetamid (HS-reactivHES D);
- Reinigung durch Dialyse und Gefriertrocknung; Kopplung mit HS-Protein durch Alkylierung.

5

Auch dieses Verfahren ist vorteilhaft; es umfaßt nur zwei Schritte und braucht nur sehr einfache Reagenzien. Das Verfahren ist somit sehr kostengünstig. Der Synthesemaßstab ist leicht erweiterbar. Die Reaktion mit dem Zielprotein ist sehr selektiv.

10

- 4. - Umsetzen des HES-Lactons (oxidiertes HES) mit einem Diamin (1,4-Diaminobutan) nach Frie (S. Frie, Diplomarbeit, Fachhochschule Hamburg, 1998) zu einem Amino-HES (E);
- 15 - Acylierung des Amino-HES mit Brom/Jodacetanhydrid ohne Basenkatalyse zum Brom/Jodacetamid (HS-reactivHES F);
- Reinigung durch Dialyse und Gefriertrocknung; Kopplung mit HS-Protein durch Alkylierung.

20

Dieser Syntheseweg unterscheidet sich von dem oben unter 3. Beschriebenen durch zusätzlichen Aufwand für die Herstellung des HES-Lactons.

CHO-reactivHES

25

Im folgenden werden alternative Verfahren zur Herstellung von CHO-reactivHES schematisch beschrieben und bewertet:

- 1. - Verwendung des Amino-HES (E) als CHO-reactivHES G;
- Kopplung mit CHO-Protein durch reduktive Aminierung.

30

Diese Synthese ist sehr einfach und kostengünstig. Die Konkurrenz interner Lysine kann gegebenenfalls Probleme erzeugen, die durch die Wahl der Reaktionsbedingungen zu kontrollieren sind.

35

- 25 -

2. - Umsetzung des HAS-Lactons (oxidiertes HES) mit Hydrazin zum Hydrazid (CHO-reaktivHES H);
- Reinigung durch Dialyse und Gefriertrocknung;
 - Kopplung mit CHO-Protein durch Hydrazonbildung bei pH 5-6; vorzugsweise sollte die Kopplungsreaktion gleich *in situ* während der oxidativen Bildung (enzymatisch oder chemisch) aus Galaktose-Resten durchgeführt werden; optional wird eine anschließende reduktive Stabilisierung mit NaCN/BH₃ durchgeführt;
 - eine enzymatische Oxidation der Galactosen sollte bevorzugt mit einem polymergebundenen Enzym durchgeführt werden, um die Abreinigung des Enzyms zu erleichtern.

Diese Synthese ist sehr einfach und selektiv (keine Konkurrenz interner Lysine). Probleme könnten sich aufgrund der Toxizität der Hydrazinderivate ergeben.

3. - Weitere Umsetzung von D oder F mit Ammoniumhydrogencarbonat zu den Glycinamiden (CHO-reaktivHES H und I);
- Reinigung durch Dialyse und Gefriertrocknung;
 - Kopplung mit CHO-Protein durch reduktive Aminierung.

Dieses Verfahren erfolgt in drei Schritten, braucht jedoch sehr einfache Reagenzien und ist somit kostengünstig. Der Synthesemaßstab ist leicht erweiterbar. Es könnte jedoch zur Konkurrenz interner Lysine kommen (vgl. oben)

4. - Acylierung des Amino-HES C oder E mit cBz-Aminooxyessigsäure mit nachfolgender Hydrierung zum Aminooxy-HES (CHO-reaktivHES K);
- Kopplung mit CHO-Protein durch Oxim-Bindung bei pH 5-6; vorzugsweise sollte die Kopplungsreaktion gleich *in situ* während der oxidativen Bildung (enzymatisch oder chemisch) aus Galaktose-Resten erfolgen;

- 26 -

- eine enzymatische Oxidation der Galactosen sollte bevorzugt mit einem polymergebundenen Enzym durchgeführt werden, um die Abreinigung des Enzyms zu erleichtern.

Diese Synthese ist aufwendig, aber die Kopplung mit dem
5 Zielprotein ist ebenso selektiv wie bei der unter 2. beschriebenen Reaktion (keine Konkurrenz interner Lysine).

10

15

20

25

30

35

Patentansprüche

1. Konjugat aus Hydroxyalkylstärke und Allergen, bei dem mindestens eine Hydroxyalkylstärke kovalent an das Allergen gekoppelt ist.
2. Konjugat nach Anspruch 1, bei dem Hydroxyalkylstärke unmittelbar oder über einen Linker an das Allergen gekoppelt vorliegt.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Hydroxyalkylstärke Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke oder Hydroxybutylstärke ist.
4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die Hydroxyethylstärke ein mittleres Molekulargewicht von 1 bis 300 kDa, vorzugsweise ein mittleres Molekulargewicht von 5 bis 200 kDa aufweist.
5. Konjugat gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Hydroxyethylstärke einen molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis von $C_2:C_6$ Substitution im Bereich von 2 bis 20, jeweils bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, aufweist.
6. Konjugat gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Allergen aus der Gruppe bestehend aus Polypeptiden oder Proteinen ausgewählt wurde.
7. Konjugat gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Allergen ein Glykoprotein ist.
8. Konjugat gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Hydroxyalkylstärke an die Polypeptidkette oder

an eine oder mehrere der Saccharidketten des Glykoproteins gekoppelt ist.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche ein Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 aufweist.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 9, die ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.
11. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zur spezifischen Immuntherapie, insbesondere für die Hyposensibilisierung.
12. Verwendung gemäß Anspruch 11, zur spezifischen Immuntherapie von Allergikern, bei denen eine IgE-vermittelte Sensibilisierung nachgewiesen ist deren klinische Symptome beobachtet wurden.
13. Verwendung gemäß Anspruch 11 oder 12, wobei die spezifische Immuntherapie zur Therapie von Pollen-, Milben-, Säugetierhaar(-speichel)-, Pilz-, Insekten-, Nahrungsmittel- und Naturkautschuk/Latex-Allergien eingesetzt wird.
14. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei die Therapie für die Behandlung von Asthmatikern, Heuschnupfen-Patienten und Patienten, die anderweitige klinisch relevante Reaktionen auf Soforttyp-Allergene aufweisen, eingesetzt wird.
15. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei die Verabreichung subkutan, mukosal, oral, peroral oder sublingual erfolgt.

- 29 -

16. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15, wobei die Immuntherapie bei Aeroallergenen präsaïsonal oder perennial durchgeführt wird.
17. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16, wobei die Immuntherapie bei Insektenallergikern im Rush- oder Ultra-Rush-Verfahren durchgeführt wird.

1/8

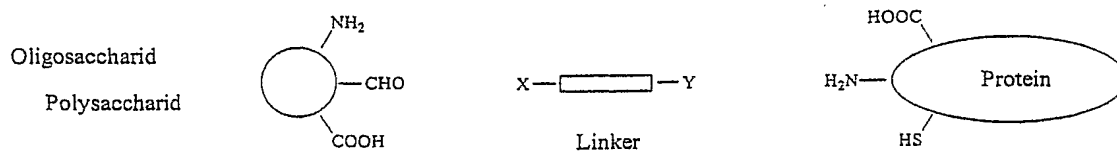
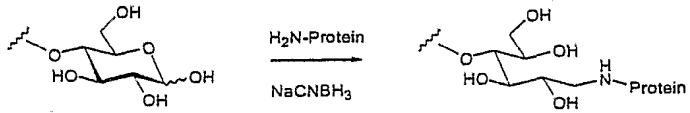
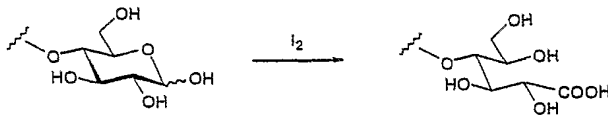
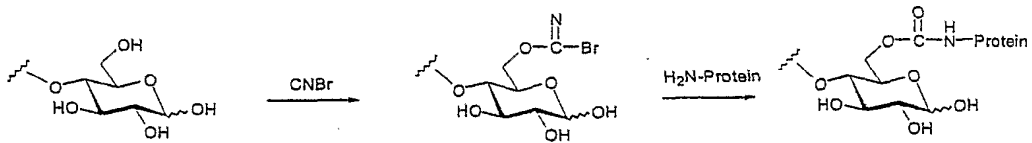


Fig. 1: Neoglycoprotein-Synthese

a) Reduktive Aminierung

b) I₂-Oxidation

c) CNBr-Aktivierung



Alternative: Aktivierung mit CDAP

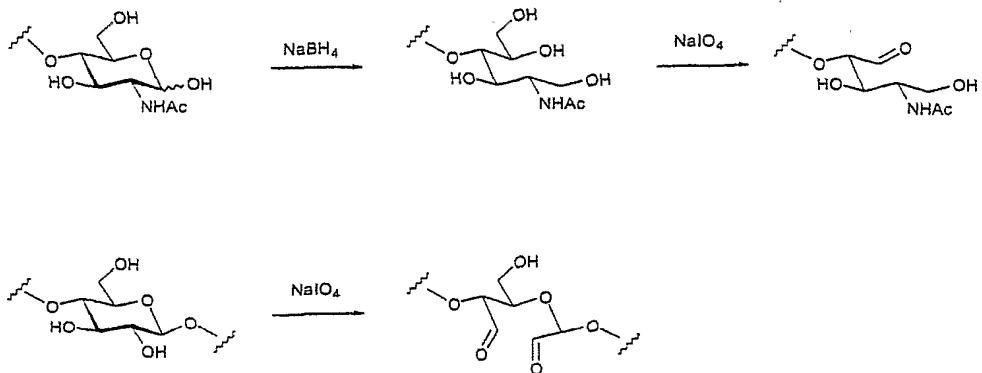
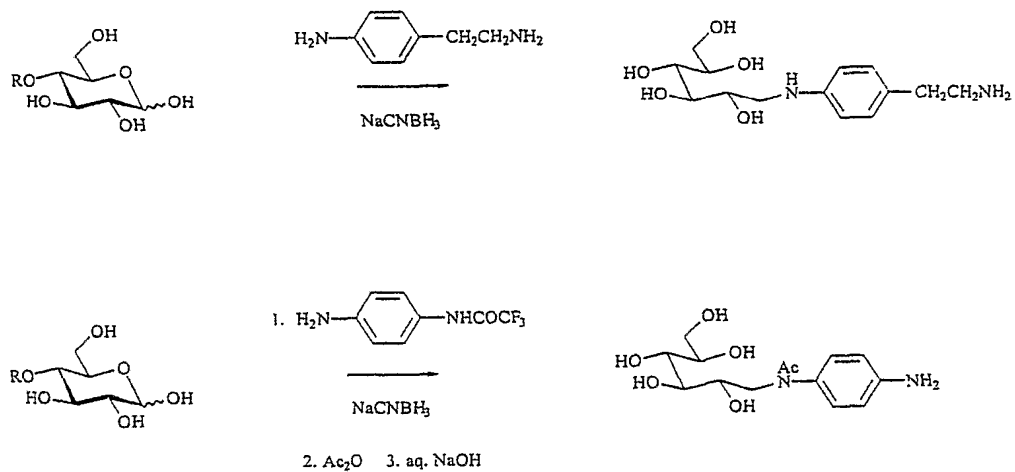
d) NaIO₄-Spaltung

Fig. 2.1: Polysaccharid-Modifizierung

a) Reduktive Aminierung



b) N-Glycosylierung

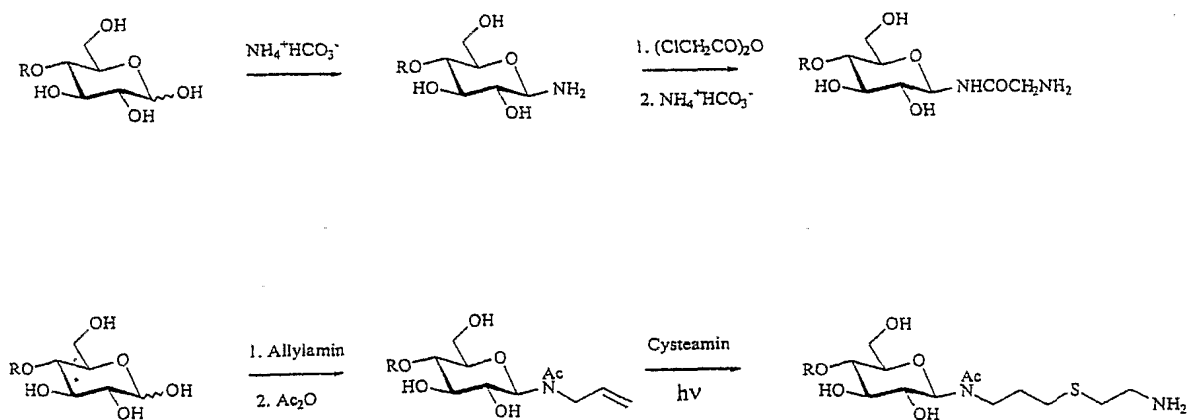
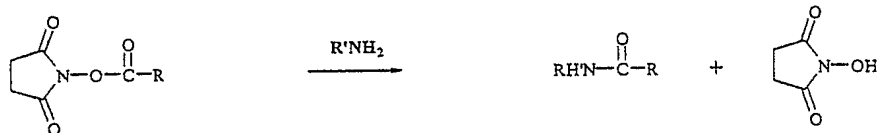


Fig. 2.2 Oligosaccharid-Modifizierung

4 / 8

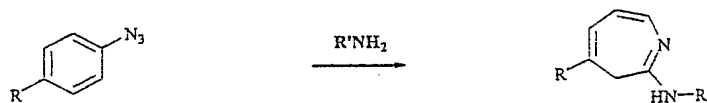
1a: N-Hydroxysuccinimide



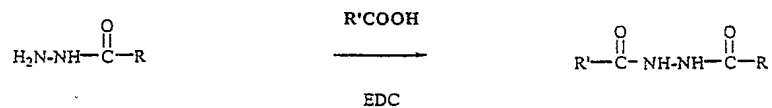
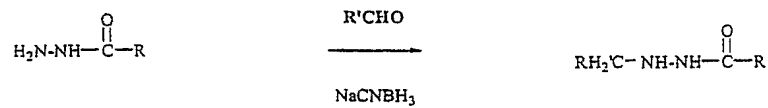
1b: Imidoester



1c: Arylazide

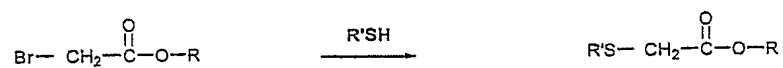


2: Hydrazide

Fig. 3: NH₂- und CHO/COOH-Kopplungsreaktionen

5/8

3a: Halogenacetate



3b: Maleinimide



3c: Pyridyldisulfide

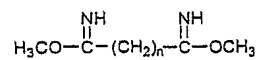


Fig.3: SH-Kopplungsreaktionen

6/8

1: homobifunktionell

a)

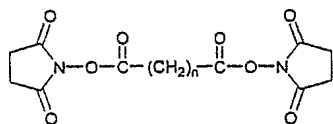


DMA (n = 4)

DMP (n = 5)

DMS (n = 6)

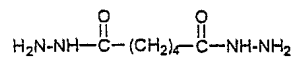
b)



DSG (n = 3)

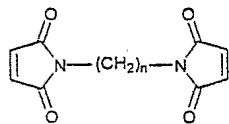
DSS (n = 6)

c)



ADH

d)



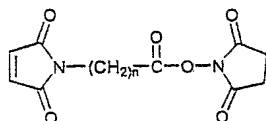
BMOE (n = 2)

BMB (n = 4)

BMH (n = 6)

2: heterobifunktionell

a)

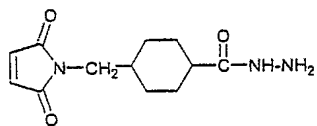


AMAS (n = 1)

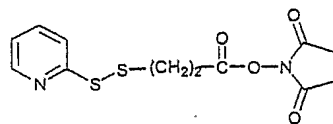
GMBS (n = 3)

EMCS (n = 5)

b)

M₂C₂H

c)

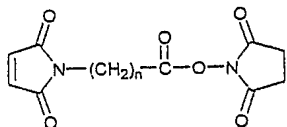


SPDP

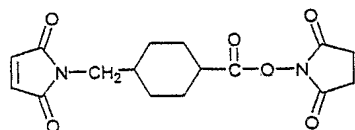
Fig.4: Cross-Linker

1: Maleinimid

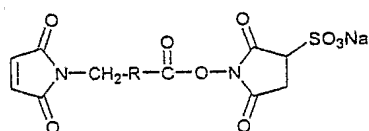
a)



AMAS ($n = 1$)
 GMBS ($n = 3$)
 EMCS ($n = 5$)

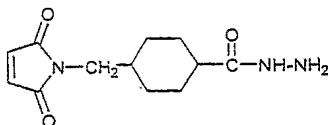


SMCC

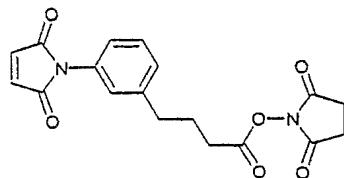


Sulfo-GMBS
 Sulfo-EMCS
 Sulfo-SMCC

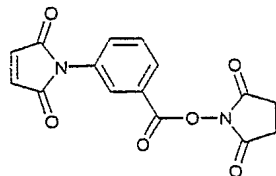
b)

M₂C₂H

c)



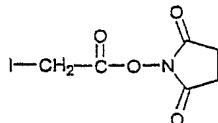
SMPB



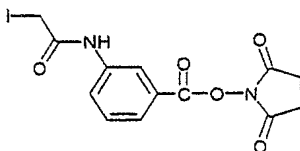
MBS

Fig. 5: Linker für SH-Kopplungen

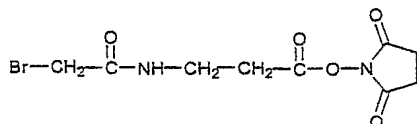
2: Halogenacetat



SIA

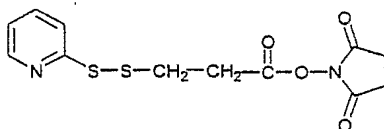


SIAB

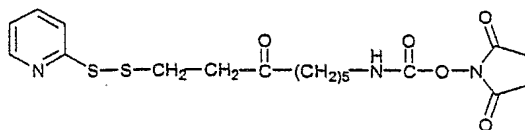


SBAP

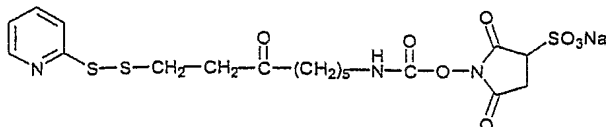
3: Pyridyldisulfid



SPDP



LC-SPDP



Sulfo-LC-SPDP

Fig. 5: Linker für SH-Kopplungen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP-03/09750

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48 A61K39/35

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 30148 A (NOVONORDISK AS ;PRENTOE ANNETTE (DK); BISGAARD FRANTZEN HENRIK (DK) 21 August 1997 (1997-08-21) page 5, line 6 -page 9, line 22 page 11, line 14 -page 17, line 22 claims 1-3,7,8,14,29,42	1-10
P, X	WO 02 080979 A (SOMMERMEYER KLAUS ;FRIE SVEN (DE); EICHNER WOLFRAM (DE); SCHARPF R) 17 October 2002 (2002-10-17) page 12, line 32 -page 13, line 10 page 25, line 14 -page 26, line 19 page 30, line 33 -page 31, line 10 claims 1-5,8,9,41,50,51,58 -/-	1-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2003

Date of mailing of the international search report

23/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/09750

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 261 973 A (LEE WENG Y ET AL) 14 April 1981 (1981-04-14) column 2, line 9 -column 3, line 58 examples 1,2 claims 1-3 ----	11-17
A	SCHAEFER T ET AL: "TWO-YEAR DOUBLE-BLIND TRIAL OF A MONOMETHOXY POLYETHYLENE GLYCOL MPEG MODIFIED GRASS POLLEN EXTRACT AT DIFFERENT DOSE LEVELS" ANNALS OF ALLERGY, vol. 68, no. 4, 1992, pages 334-339, XP009022545 ISSN: 0003-4738 the whole document ----	1-17
A	DREBORG S ET AL: "IMMUNOTHERAPY WITH MONOMETHOXPOLYETHYLENE GLYCOL MODIFIED ALLERGENS" CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, vol. 6, no. 4, 1990, pages 315-365, XP009022546 ISSN: 0743-4863 the whole document ----	1-17
E	WO 03 074087 A (HEMBERGER JUERGEN ;ORLANDO MICHELE (DE); BIOTECHNOLOGIE GES MITTEL) 12 September 2003 (2003-09-12) page 5, line 1 -page 16, line 29 claims 1-14,17,19 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/09750

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/09750

BOX I.1

Although claims 11-17 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

BOX I.1

Claims No.: 11-17

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09750

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9730148	A	21-08-1997	AU 725287 B2	12-10-2000
			AU 1540697 A	02-09-1997
			CA 2242488 A1	21-08-1997
			CN 1211278 A	17-03-1999
			WO 9730148 A1	21-08-1997
			EP 0894128 A1	03-02-1999
			JP 2000506119 T	23-05-2000
			US 6106828 A	22-08-2000
WO 02080979	A	17-10-2002	DE 10112825 A1	02-10-2002
			CZ 20032430 A3	12-11-2003
			WO 02080979 A2	17-10-2002
US 4261973	A	14-04-1981	GB 1578348 A	05-11-1980
			AT 359637 B	25-11-1980
			AT 592477 A	15-04-1980
			AU 520366 B2	28-01-1982
			AU 2794277 A	22-02-1979
			BE 857869 A1	17-02-1978
			CA 1091153 A1	09-12-1980
			CH 641681 A5	15-03-1984
			DE 2736223 A1	23-02-1978
			DK 364277 A ,B,	18-02-1978
			FR 2362156 A1	17-03-1978
			JP 1016812 B	27-03-1989
			JP 1537301 C	21-12-1989
			JP 53024033 A	06-03-1978
			NL 7709025 A	21-02-1978
			NO 772848 A ,B	20-02-1977
			SE 448147 B	26-01-1987
			SE 7709233 A	18-02-1978
WO 03074087	A	12-09-2003	DE 10209821 A1	25-09-2003
			WO 03074087 A1	12-09-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09750

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61K47/48 A61K39/35		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 30148 A (NOVONORDISK AS ;PRENTOE ANNETTE (DK); BISGAARD FRANTZEN HENRIK (DK) 21. August 1997 (1997-08-21) Seite 5, Zeile 6 -Seite 9, Zeile 22 Seite 11, Zeile 14 -Seite 17, Zeile 22 Ansprüche 1-3,7,8,14,29,42	1-10
P,X	WO 02 080979 A (SOMMERMEYER KLAUS ;FRIE SVEN (DE); EICHNER WOLFRAM (DE); SCHARPF R) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) Seite 12, Zeile 32 -Seite 13, Zeile 10 Seite 25, Zeile 14 -Seite 26, Zeile 19 Seite 30, Zeile 33 -Seite 31, Zeile 10 Ansprüche 1-5,8,9,41,50,51,58 --- -/-	1-10
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*C* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*G* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 8. Dezember 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 23/12/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Ulbrecht, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 261 973 A (LEE WENG Y ET AL) 14. April 1981 (1981-04-14) Spalte 2, Zeile 9 -Spalte 3, Zeile 58 Beispiele 1,2 Ansprüche 1-3 ----	11-17
A	SCHAEFER T ET AL: "TWO-YEAR DOUBLE-BLIND TRIAL OF A MONOMETHOXY POLYETHYLENE GLYCOL MPEG MODIFIED GRASS POLLEN EXTRACT AT DIFFERENT DOSE LEVELS" ANNALS OF ALLERGY, Bd. 68, Nr. 4, 1992, Seiten 334-339, XP009022545 ISSN: 0003-4738 das ganze Dokument ----	1-17
A	DREBORG S ET AL: "IMMUNOTHERAPY WITH MONOMETHOXY POLYETHYLENE GLYCOL MODIFIED ALLERGENS" CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, Bd. 6, Nr. 4, 1990, Seiten 315-365, XP009022546 ISSN: 0743-4863 das ganze Dokument ----	1-17
E	WO 03 074087 A (HEMBERGER JUERGEN ;ORLANDO MICHELE (DE); BIOTECHNOLOGIE GES MITTEL) 12. September 2003 (2003-09-12) Seite 5, Zeile 1 -Seite 16, Zeile 29 Ansprüche 1-14,17,19 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/09750

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 11-17
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN**PCT/ISA/ 210**

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 11-17 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Ansprüche Nr.: 11-17

Regel 39.1(iv) PCT – Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 03/09750

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9730148 A	21-08-1997	AU 725287 B2	12-10-2000
		AU 1540697 A	02-09-1997
		CA 2242488 A1	21-08-1997
		CN 1211278 A	17-03-1999
		WO 9730148 A1	21-08-1997
		EP 0894128 A1	03-02-1999
		JP 2000506119 T	23-05-2000
		US 6106828 A	22-08-2000
WO 02080979 A	17-10-2002	DE 10112825 A1	02-10-2002
		CZ 20032430 A3	12-11-2003
		WO 02080979 A2	17-10-2002
US 4261973 A	14-04-1981	GB 1578348 A	05-11-1980
		AT 359637 B	25-11-1980
		AT 592477 A	15-04-1980
		AU 520366 B2	28-01-1982
		AU 2794277 A	22-02-1979
		BE 857869 A1	17-02-1978
		CA 1091153 A1	09-12-1980
		CH 641681 A5	15-03-1984
		DE 2736223 A1	23-02-1978
		DK 364277 A ,B,	18-02-1978
		FR 2362156 A1	17-03-1978
		JP 1016812 B	27-03-1989
		JP 1537301 C	21-12-1989
		JP 53024033 A	06-03-1978
		NL 7709025 A	21-02-1978
		NO 772848 A ,B	20-02-1977
		SE 448147 B	26-01-1987
		SE 7709233 A	18-02-1978
WO 03074087 A	12-09-2003	DE 10209821 A1	25-09-2003
		WO 03074087 A1	12-09-2003